

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
31. Juli 2003 (31.07.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 03/062423 A2**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **C12N 15/11** (74) Anwalt: **GASSNER, Wolfgang**; Nägelsbachstr. 49 A, 91052 Erlangen (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP03/00608

(22) Internationales Anmeldedatum:  
22. Januar 2003 (22.01.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
102 02 419.7 22. Januar 2002 (22.01.2002) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **RIBOPHARMA AG** [DE/DE]; Fritz-Hornschuch-Str. 9, 95326 Kulmbach (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **HEIDENREICH, Olaf** [DE/DE]; Friedrich-Schaal-Str. 22, 72074 Tübingen (DE). **VORNLOCHER, Hans-Peter** [DE/DE]; Lise-Meitner-Platz 4, 95448 Bayreuth (DE). **KREUTZER, Roland** [DE/DE]; Glotzdorf 26, 95466 Weidenberg (DE). **LIMMER, Stefan** [DE/DE]; Gutenbergstr. 9, 95512 Neudrossenfeld (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) **Title:** METHOD FOR INHIBITING THE EXPRESSION OF A TARGET GENE RESULTING FROM A CHROMOSOME ABERRATION

**WO 03/062423 A2**

(54) **Bezeichnung:** VERFAHREN ZUR HEMMUNG DER EXPRESSION EINES DURCH EINE CHROMOSOMEN-ABERRATION ENTSTANDENEN ZIELGENS

(57) **Abstract:** The invention relates to a method for inhibiting the expression of a target gene resulting from a chromosome aberration of at least two genes, said gene being fused in a cell, wherein the target gene has a segment A containing the fusion site and at least one double-stranded ribonucleic acid (dsRNA) is introduced into the cell, the first strand (S1) of which has an area that complements segment A at least in certain areas.

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Hemmung der Expression eines durch eine Chromosomen-Aber- ration entstandenen aus mindestens zwei Genen an einer Fusionsstelle fusionierten Zielgens in einer Zelle, wobei das Zielgen einen die Fusionsstelle enthaltenden Abschnitt A aufweist und mindestens eine doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA) in die Zelle eingeführt wird, deren erster Strang S1 einen zu dem Abschnitt A zumindest abschnittsweise komplementären Bereich aufweist.

**Verfahren zur Hemmung der Expression eines durch eine Chromosomen-Aberration entstandenen Zielgens**

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Hemmung der Expression eines durch eine Chromosomen-Aberration entstandenen Zielgens und ein Medikament zur Therapie einer durch eine Chromosomen-Aberration verursachten Erkrankung. Weiterhin betrifft die Erfindung eine doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA) und deren Verwendung zur Hemmung der Expression eines durch eine Chromosomen-Aberration entstandenen Zielgens.

Aus der WO 99/32619 ist ein Verfahren zur Hemmung der Expression eines Zielgens mittels eines doppelsträngigen Oligoribonukleotids bekannt. Das bekannte Verfahren zielt auf die Hemmung der Expression von Genen in Zellen von Invertebraten ab. Dazu ist es erforderlich, dass das doppelsträngige Oligoribonukleotid eine zum Zielgen identische Sequenz mit einer Länge von mindestens 25 Basen aufweist.

Ein Verfahren zur Hemmung der Expression eines Zielgens in einer Zelle sowie ein Medikament sind aus der WO 00/44895 bekannt. Bei dem Verfahren wird ein Oligoribonukleotid mit doppelsträngiger Struktur (dsRNA) in die Zelle eingeführt. Ein Strang der dsRNA weist einen zum Zielgen zumindest abschnittsweise komplementären aus höchstens 49 aufeinanderfolgenden Nukleotidpaaren bestehenden Bereich auf. Das Medikament enthält mindestens eine dsRNA zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Zielgens, wobei ein Strang der dsRNA zum Zielgen zumindest abschnittsweise komplementär ist.

Aus Sharp, P.A., Genes & Development (2001), 15, Seiten 485 bis 490 ist es bekannt, dass mittels dsRNA die Expression von Genen gehemmt werden kann. In zellfreien Extrakten wurde ge-

zeigt, dass dsRNA in kurze 21-23 Nukleotide lange RNAs gespalten wird, welche als siRNAs bezeichnet werden. Die siRNAs werden letztendlich für die Spaltung von Ziel-mRNA verantwortlich gemacht. DsRNA eines verwandten Gens kann zur Hemmung der Expression eines Zielgens verwendet werden, sofern die Gene identische und ununterbrochene Abschnitte von vermutlich mehr als 30-35 Nukleotide teilen.

Aus der WO 01/75164 A2 ist es bekannt, eine einer Sequenz einer Sequenz eines Zielgens entsprechende dsRNA durch die Aktivität eines löslichen RNA-Interferenz vermittelnden Extrakts zu RNA von etwa 21 bis 23 Nukleotiden zu prozessieren. Die prozessierte RNA wird dann zur Vermittlung der RNA-Interferenz in eine Zelle oder einen Organismus eingeführt.

In Sijen, T. et al., Cell (2001), 107, Seiten 465 bis 476 und Lipardi, C. et al., Cell (2001), 107, Seiten 297 bis 307 wird beschrieben, dass der Antisinn-Strang einer siRNA intrazellulär an einer Zielsequenz einer dazu komplementären mRNA bindet. Der Antisinn-Strang wird an der mRNA verlängert und bildet zusammen mit der mRNA eine neue dsRNA. Die entstehende dsRNA wird anschließend wieder in kleine Fragmente gespalten, so dass neue siRNA entsteht. Die daraus resultierende Vervielfältigung der siRNAs wird für die hohe Effizienz der RNA-Interferenz verantwortlich gemacht.

Aus Cobaleda, C. und Sánchez-Garcia, I., Blood (2000), 95 (3), Seiten 731 bis 737 ist es bekannt, dass Nukleotidsequenzen der Fusionsstelle zwischen bcr- und abl-Sequenzen im bcr-abl-Fusionsgen geeignete therapeutische Ziele darstellen. Die diesen Sequenzen entsprechenden mRNAs lassen sich durch eine Zielsequenz-spezifische katalytische RNA-Untereinheit von RNase P spalten. Diese katalytische RNA-Untereinheit ist ein

verhältnismäßig großes Molekül, welches sich sinnvoll nur auf enzymatischem Wege und nicht durch Festphasensynthese herstellen lässt. Die Bereitstellung der katalytische RNA-Untereinheit ist daher aufwändig. Weiterhin ist es schwierig 5 ein derart großes Molekül in Zellen einzubringen. Für eine therapeutische Verabreichung ist die effiziente Freisetzung des Agens ein bisher ungelöstes Problem. Damit ist die praktische Verwendbarkeit der sequenz-spezifischen katalytischen RNA-Untereinheit von RNase P insgesamt fraglich.

10

Bei einer Chromosomen-Aberration handelt es sich um strukturelle Änderungen und Defekte ein oder mehrerer Chromosomen. Dabei kann es zu einem Verlust oder zu einer Vervielfältigung von Genmaterial kommen. Es kann zu einer Translokation, einer 15 Inversion, einer Deletion, einer Insertion, einer Duplikation oder einer Ringbildung kommen. Bei der Duplikation sind einzelne Chromosomenabschnitte verdoppelt. Bei der Inversion liegt ein Chromosomenabschnitt mit umgekehrter Nukleotidsequenz vor. Unter Deletion versteht man einen Stückverlust eines 20 Chromosoms. Bei einer Translokation findet ein Stücktausch zwischen nicht homologen Chromosomen statt. Bei einer Chromosomen-Aberration kann ein aus mindestens zwei Genen fusioniertes Gen entstehen. Steht dieses so entstandene mutierte 25 Gen unter der Kontrolle eines Promotors, so kann es exprimiert werden und dadurch eine Beeinträchtigung hervorrufen. Diese Beeinträchtigung kann beispielsweise eine Erkrankung des hämatopoetischen Systems sein, wie eine akute myeloische Leukämie (AML) oder eine chronisch myeloische Leukämie (CML). 30 Akute myeloische Leukämien sind heterogene, maligne Erkrankungen des hämatopoetischen Systems. Der Verlust des Differenzierungspotenzials unter Beibehaltung der Proliferationsfähigkeit hat eine Expansion eines malignen Zellklons und die

Verdrängung der normalen Hämatopoese zur Folge. Unbehandelt führt AML meist innerhalb weniger Wochen zum Tod des Patienten. Die Inzidenz von AML ist altersabhängig und steigt von 1/100.000 bei unter Dreißigjährigen auf 14/100.000 bei über 5 Siebzigjährigen an.

Bis zu 90% der adulten AML-Fälle weisen chromosomale Aberrationen auf. Eine der häufigsten Aberrationen ist die Translokation t(8;21) (q22;q22), die in 10-15% aller AML-Fälle auftritt. Bei dieser Translokation wird der für die Hämatopoese essentielle Transkriptionsfaktor AML-1 mit dem Transkriptionsrepressor MTG8 fusioniert. Das resultierende Fusionsprotein AML-1/MTG8 besitzt anstatt der C-terminalen Transaktivierungsdomäne von AML-1 die fast vollständige MTG8-Sequenz. 10 Die dadurch bewirkte Änderungen der hämatopoetischen Genexpression führen in CD34-positiven Zellen zu einer Inhibition der Zelldifferenzierung und zu einer Initiation der leukämischen Transformation der betroffenen Zellen. Die Sequenz aus 15 der Datenbank GenBank, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, 20892, USA mit der Eintragungsnummer S 45790 offenbart eine Sequenz eines Fusionsgens aml-1/mtg8, welches 20 auch als aml1/eto bezeichnet wird.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, die Nachteile nach 25 dem Stand der Technik zu beseitigen. Es soll insbesondere ein Verfahren, ein Medikament, ein Agens sowie eine Verwendung des Agens angegeben werden, mit dem bzw. der die Expression eines durch eine Chromosomen-Aberration entstandenen aus mindestens zwei Genen fusionierten Zielgens in einer Zelle spezifisch und effizient gehemmt werden kann.

Diese Aufgabe wird durch die Merkmale der Ansprüche 1, 16, 33 und 47 gelöst. Vorteilhafte Ausgestaltungen ergeben sich aus den Ansprüche 2 bis 15, 17 bis 32 und 34 bis 46.

Nach Maßgabe der Erfindung ist ein Verfahren zur Hemmung der Expression eines durch eine Chromosomen-Aberration entstandenen aus mindestens zwei Genen an einer Fusionsstelle fusionierten Zielgens in einer Zelle vorgesehen, wobei das Zielgen

5 einen die Fusionsstelle enthaltenden Abschnitt A aufweist und mindestens eine doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA) in die Zelle eingeführt wird, deren erster Strang S1 einen zu dem Abschnitt A zumindest abschnittsweise komplementären Bereich aufweist. Der Abschnitt A weist dabei zumindest zwei

10 Nukleotide auf jeder Seite der Fusionsstelle und der komplementäre Bereich des Strangs S1 der dsRNA 19 bis 24 Nukleotide auf. Unter dem "Zielgen" wird im Allgemeinen der Abschnitt eines DNA-Strangs der doppelsträngigen DNA in der Zelle verstanden, welcher komplementär zu einem bei der Transkription

15 des Zielgens als Matrize dienenden Abschnitt des anderen DNA-Strangs der doppelsträngigen DNA einschließlich aller transkribierten Bereiche ist. Bei dem Zielgen handelt es sich also im Allgemeinen um den Sinn-Strang. Der Strang S1 kann somit komplementär zu einem bei der Expression des Zielgens gebildeten RNA-Transkript oder dessen Prozessierungsprodukt, wie z.B. einer mRNA, sein. Eine dsRNA liegt vor, wenn die aus einem oder zwei Ribonukleinsäure-Strängen bestehende Ribonukleinsäure eine doppelsträngige Struktur aufweist. Nicht alle Nukleotide der dsRNA müssen Watson-Crick-Basenpaarungen aufweisen. Insbesondere einzelne nicht komplementäre Basenpaare beeinträchtigen das Verfahren kaum oder gar nicht. Die maximal mögliche Zahl der Basenpaare ist die Zahl der Nukleotide in dem kürzesten in der dsRNA enthaltenen Strang, sofern die dsRNA aus zwei Strängen besteht. Der Abschnitt A "enthält"

20 die Fusionsstelle, wenn sich auf einer Seite der Fusionsstelle mindestens ein Nukleotid befindet. Der Rest des Abschnitts A umfaßt Nukleotide auf der anderen Seite der Fusionsstelle. Das bedeutet, dass sich die Fusionsstelle weder ganz am An-

fang noch ganz am Ende des Abschnitts A befindet. Der Abschnitt A sollte mindestens 16 Nukleotide umfassen. Unter "eingeführt werden" wird das Aufnehmen in die Zelle verstanden. Das Aufnehmen kann durch die Zelle selbst erfolgen. Es kann aber auch durch Hilfsstoffe oder Hilfsmittel vermittelt werden. Der Strang S1 ist abschnittsweise komplementär zu dem Abschnitt A des Zielgens, wenn er im wesentlichen dazu komplementär ist. Einzelne oder wenige nicht komplementäre Nukleotide schaden nicht, sofern sich die Nukleotide des Zielgens, zu denen diese nicht komplementär sind, nicht im Bereich der Fusionsstelle befinden. Dieser Bereich kann beiderseits der Fusionsstelle bis zu drei Nukleotide umfassen.

Ein entscheidendes Problem bei der Inhibition der Expression eines Fusionsgens besteht in der Spezifität der Inhibition. Das Fusionsgen weist Sequenzen auf, welche mit Sequenzen zellulärer Gene identisch sind, deren Expression nicht gehemmt werden soll. In Sharp, P.A., Genes & Development (2001), 15, Seiten 485 bis 490 ist die Möglichkeit beschrieben, dsRNA eines verwandten Gens zur Hemmung der Expression eines Zielgens zu verwenden. Da ein Fusionsgen mit den zellulären Genen, aus denen es zusammengesetzt ist, hochgradig verwandt ist, war anzunehmen, dass bei der Hemmung der Expression eines Fusionsgens durch RNA-Interferenz gleichzeitig die Expression dieser zellulären Gene gehemmt wird.

Würde das aus der WO 01/75164 A2 bekannte Verfahren zur Hemmung der Expression eines Fusionsgens eingesetzt werden, würden aus der vorgesehenen größeren dsRNA ebenso RNAs gebildet werden, welche jeweils nur zu Abschnitten des Fusionsgens komplementär sind, die ausschließlich einem der zellulären Gene entsprechen, aus denen das Fusionsgen zusammengesetzt ist. Beim Einsatz des bei der Prozessierung entstandenen Ge-

misches verschiedener RNAs, würde auch die Expression dieser zellulären Gene gehemmt werden. Die Hemmung der Expression eines Fusionsgens wäre nicht spezifisch.

5 Gemäß dem in Sijen, T. et al., Cell (2001), 107, Seiten 465 bis 476 und Lipardi, C. et al., Cell (2001), 107, Seiten 297 bis 307 beschriebenen Wirkmechanismus würde beim Einsatz einer gegen die Fusionsstelle gerichteten siRNA ein Einzelstrang dieser siRNA verlängert werden. Der Einzelstrang würde  
10 in einen Bereich hinein verlängert werden, der zu einem zellulären Gen komplementär ist, welches teilweise Bestandteil des Fusionsgens ist. Die bei der anschließenden Spaltung der Verlängerungsprodukte gebildeten neuen siRNAs würden zum Teil ausschließlich dem Abschnitt des Fusionsgens entsprechen,  
15 welcher dem zellulären Gen entspricht. Es würde nicht nur die Expression des Fusionsgens sondern auch die Expression des zellulären Gens gehemmt werden.

Es hat sich aber überraschenderweise gezeigt, dass es das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht, spezifisch die Expression von fusionierten Genen effizient zu inhibieren. Dadurch kann eine durch eine Chromosomen-Aberration verursachte Beeinträchtigung weit gehend verhindert werden. Unerwünschte Nebeneffekte sind nicht bekannt. Die intrazelluläre Konzentration einer zur Expression des Zielgens gebildeten mRNA kann durch das Verfahren nahezu auf Null reduziert werden. Durch Einführen einer dsRNA, die keinen zum Zielgen zumindest abschnittsweise komplementären Bereich aufweist, kann die Konzentration der genannten mRNA nicht reduziert werden.  
25 Weist die dsRNA einen zu einem die Fusionsstelle nicht umfassenden Abschnitt B des Zielgens zumindest abschnittsweise komplementären Bereich auf, so kann dadurch auch die Expression normaler, d.h. nicht mutierter bzw. fusionierter, Gene gehemmt werden.  
30

Vorzugsweise weist der die Fusionsstelle umfassende Abschnitt A zumindest drei Nukleotide auf jeder Seite der Fusionsstelle auf. Bei einem bspw. 21 Nukleotide langen Abschnitt A können dann z.B. drei Nukleotide auf der einen und 18 Nukleotide auf 5 der anderen Seite der Fusionsstelle angeordnet sein. Dadurch ist eine besonders effiziente und spezifische Hemmung der Expression des Zielgens zu erreichen.

Als besonders vorteilhaft hat es sich erwiesen, wenn zumindest ein Ende der dsRNA einen aus 1 bis 4, insbesondere 1 10 oder 2, Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist. Eine solche dsRNA weist gegenüber einer dsRNA ohne einzelsträngige Überhänge an mindestens einem Ende eine bessere Wirksamkeit bei der Hemmung der Expression des Zielgens 15 auf. Ein Ende ist dabei ein Bereich der dsRNA, in welchem ein 5'- und ein 3'-Strangende vorliegen. Eine nur aus dem Strang S1 bestehende dsRNA weist demnach eine Schleifenstruktur und nur ein Ende auf. Eine aus dem Strang S1 und einem dazu zu- 20 mindest weit gehend komplementären Strang S2 gebildete dsRNA weist zwei Enden auf. Ein Ende wird dabei jeweils von einem auf dem Strang S1 und einem auf dem Strang S2 liegenden Strangende gebildet.

Vorzugsweise befindet sich der einzelsträngige Überhang am 25 3'-Ende des Strangs S1. Diese Lokalisation des einzelsträngigen Überhangs führt zu einer weiteren Steigerung der Effizi- enz des Verfahrens. In einem Ausführungsbeispiel weist die dsRNA nur an einem, insbesondere dem am 3'-Ende des Strangs S1 gelegenen, Ende einen einzelsträngigen Überhang auf. Das 30 andere Ende ist bei einer zwei Enden aufweisenden dsRNA glatt, d.h. ohne Überhänge, ausgebildet. Überraschenderweise hat es sich gezeigt, dass zur Verstärkung der Interferenz- Wirkung der dsRNA ein Überhang an einem Ende der dsRNA aus-

reichend ist, ohne dabei die Stabilität in einem solchen Maße zu erniedrigen wie durch zwei Überhänge. Eine dsRNA mit nur einem Überhang hat sich sowohl in verschiedenen Zellkulturmedien als auch in Blut, Serum und Zellen als hinreichend beständig und besonders Wirksam erwiesen.

Der komplementäre Bereich des Strangs S1 der dsRNA kann 20 bis 23, insbesondere 22, Nukleotide aufweisen. Eine dsRNA mit dieser Struktur ist besonders effizient in der Inhibition des Zielgens. Der Strang S1 der dsRNA kann weniger als 30, vorzugsweise weniger als 25, besonders vorzugsweise 21 bis 24, Nukleotide aufweisen. Die Zahl dieser Nukleotide ist zugleich die Zahl der in der dsRNA maximal möglichen Basenpaare. Eine solche dsRNA ist intrazellulär besonders beständig.

Mindestens ein Ende der dsRNA kann modifiziert werden, um einem Abbau in der Zelle oder einer Dissoziation der doppelsträngigen Struktur in die Einzelstränge entgegenzuwirken. Weiterhin kann der durch komplementäre Nukleotidpaare bewirkte Zusammenhalt der doppelsträngigen Struktur durch mindestens eine, vorzugsweise zwei, weitere chemische Verknüpfung/en erhöht werden. Die chemische Verknüpfung kann durch eine kovalente oder ionische Bindung, eine Wasserstoffbrückenbindung, hydrophobe Wechselwirkungen, vorzugsweise van-der-Waals- oder Stapelungswechselwirkungen, oder durch Metall-Ionenkoordination gebildet werden. Sie kann auch durch in der doppelsträngigen Struktur anstelle von Purinen benutzten Purinanaloga gebildet werden. Die Verknüpfung wird bevorzugt an einem Ende der dsRNA, insbesondere durch Verbindung mittels eines Hexaethylenglykol-Linkers, gebildet. Als besonders effizient hat sich die dsRNA erwiesen, wenn die Verknüpfung zwischen dem 5'-Ende des Strangs S1 und dem 3'-Ende des

zum Strang S1 zumindest weit gehend komplementären Strangs S2 der dsRNA gebildet wird.

Die Verknüpfung mittels eines Hexaethylenglykol-Linkers ist  
5 z.B. in D. Jeremy Williams, Kathleen B. Hall, Biochemistry (1996) 35, Seiten 14665-14670 beschrieben. Um eine einen Hexaethylenglykol-Linker enthaltende dsRNA zu synthetisieren, kann wie folgt vorgegangen werden: Zunächst wird eine Festphasensynthese des Strangs S1 mittels Ribonukleosid-Phosphoramiditen (Proligo Biochemie GmbH, Georg-Hyken-Str.14, Hamburg, Deutschland) durchgeführt. An den festphasengebundenen Strang S1 wird das Phosphoramidit des Hexaethylenglykols (Cruachem Ltd., Todd Campus, West of Scotland Science Park, Acre Road, Glasgow, G20 0UA, Schottland, Großbritannien) gekoppelt. Dabei wird derselbe Kopplungsmechanismus wie bei der Festphasensynthese von Oligoribonukleotiden verwendet. Die Festphasensynthese wird fortgesetzt, indem an das Hexaethylenglykol weitere Nukleotide des Strangs S2 mittels Ribonukleosid-Phosphoramiditen gekoppelt werden. Nach Abschluss der 10 Festphasensynthese und Reinigung wird der synthetisierte RNA-Hexaethylenglykol-RNA-Strang auf etwa 90 °C erhitzt und anschließend über drei Stunden auf Raumtemperatur abgekühlt. Dabei hybridisieren der Strang S1 und der Strang S2 zur 15 dsRNA.

25

Das Zielgen kann ein aus den Genen für AML-1 und für MTG8 fusioniertes Gen sein. Dann besteht die dsRNA vorzugsweise aus dem Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 und dem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 gemäß dem anliegenden Sequenz- 30 protokoll. Eine solche dsRNA ist in der Hemmung der Expression eines aus den Genen für AML-1 und für MTG8 fusionierten Zielgens besonders wirksam. Bei der Zelle kann es sich um einen Leukozyten, insbesondere eine myeloische Zelle, handeln.

Zum Einbringen der dsRNA in die Zelle kann eine die dsRNA umschließende micellare Struktur, vorzugsweise ein Liposom, oder eine polymere Nano- oder Mikrokapsel oder ein die dsRNA umschließendes Kapsid oder Kapsoid verwendet werden. Die 5 dsRNA kann auch an einer polymeren Nano- oder Mikrokapsel gebunden sein. Eine micellare Struktur, ein Kapsid, ein Kapsoid oder eine polymere Nano- oder Mikrokapsel kann die Aufnahme der dsRNA in Zellen erleichtern. Das Kapsid kann insbesondere ein virales natürliches Kapsid oder ein auf chemischem oder 10 enzymatischem Weg hergestelltes künstliches Kapsid oder eine davon abgeleitete Struktur sein. Die polymere Nano- oder Mikrokapsel besteht aus mindestens einem biologisch abbaubaren Polymer, z.B. Polybutylcyanoacrylat. Sie kann darin enthaltene oder daran gebundene dsRNA im Körper transportieren und 15 freisetzen.

Weiterhin betrifft die Erfindung ein Medikament zur Therapie einer durch eine Chromosomen-Aberration verursachten Erkrankung enthaltend mindestens eine doppelsträngige Ribonuklein-20 säure (dsRNA) zur Hemmung der Expression eines durch die Chromosomen-Aberration entstandenen aus mindestens zwei Genen an einer Fusionsstelle fusionierten Zielgens, wobei das Zielgen einen die Fusionsstelle enthaltenden Abschnitt A aufweist und ein Strang S1 der dsRNA einen zu dem Abschnitt A zumindest abschnittsweise komplementären Bereich aufweist. Der Abschnitt A weist dabei zumindest zwei Nukleotide auf jeder Seite der Fusionsstelle und der komplementäre Bereich des Strangs S1 der dsRNA 19 bis 24 Nukleotide auf. Das Medikament ist so zu dosieren, dass die Hemmung der Expression mindestens eines Zielgens erreicht werden kann. Überraschenderweise hat sich gezeigt, dass ein solches Medikament dazu sehr niedrig dosiert eingesetzt werden kann. Eine Dosierung von 25 30 5 mg dsRNA pro Kilogramm Körpergewicht und Tag sind ausrei-

chend, um eine Hemmung oder vollständige Unterdrückung der Expression des Zielgens zu erreichen. Weiterhin hat sich gezeigt, dass das Medikament hochspezifisch nur die Expression des Zielgens, nicht aber die Expression der zum Zielgen fusionierten, ursprünglich auf verschiedenen Chromosomen lokalisierten einzelnen Gene hemmt. Aufgrund der möglichen niedrigen Dosierung und der hohen Spezifität des Medikaments können Nebenwirkungen weitgehend ausgeschlossen werden.

10 Besonders vorteilhaft ist es, wenn der Abschnitt A zumindest drei Nukleotide auf jeder Seite der Fusionsstelle aufweist. Vorzugsweise weist zumindest ein Ende der dsRNA einen aus 1 bis 4, insbesondere 1 oder 2, Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang auf. Der einzelsträngige Überhang kann 15 sich am 3'-Ende des Strangs S1 befinden. Besonders bevorzugt weist die dsRNA nur an einem, insbesondere dem am 3'-Ende des Strangs S1 gelegenen, Ende einen einzelsträngigen Überhang auf. Es hat sich herausgestellt, dass eine solche dsRNA im Körper besonders beständig ist. Sie wird in Blut langsamer 20 abgebaut bzw. ausgeschieden als eine dsRNA mit einzelsträngigen Überhängen an beiden Enden. Dadurch ist eine niedrige Dosierung möglich.

Der komplementäre Bereich des Strangs S1 der dsRNA kann 20 bis 23, insbesondere 22, Nukleotide aufweisen. Der Strang S1 kann weniger als 30, vorzugsweise weniger als 25, besonders vorzugsweise 21 bis 24, Nukleotide aufweisen. Bei einer Ausführungsform ist mindestens ein Ende der dsRNA modifiziert, um einem Abbau in den Zellen oder einer Dissoziation in die 25 Einzelstränge entgegenzuwirken. Der durch komplementäre Nukleotidpaare bewirkte Zusammenhalt der doppelsträngigen Struktur kann durch mindestens eine, vorzugsweise zwei, weitere chemische Verknüpfung/en erhöht sein.

Die Verknüpfung ist vorzugsweise an einem Ende der dsRNA, insbesondere durch Verbindung mittels eines Hexaethylenglykol-Linkers, gebildet. Besonders vorteilhaft ist es, wenn die 5 Verknüpfung zwischen dem 5'-Ende des Strangs S1 und dem 3'-Ende eines zweiten Strangs S2 der dsRNA gebildet ist.

Das Zielgen ist vorzugsweise ein aus den Genen für AML-1 und für MTG8 fusioniertes Gen. Dann kann die dsRNA aus dem Strang 10 S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 und dem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 gemäß dem anliegenden Sequenzprotokoll bestehen. Die mit dem Medikament zu behandelnde Erkrankung kann eine akute myeloische Leukämie oder eine chronisch myeloische Leukämie sein. Die dsRNA kann in dem Medikament in einer Lösung 15 oder von einer micellaren Struktur, vorzugsweise einem Liposom, oder einem Kapsid, einem Kapsoid oder einer polymeren Nano- oder Mikrokapsel umschlossen oder an einer polymeren Nano- oder Mikrokapsel gebunden vorliegen. Eine micellare Struktur, ein Kapsid, ein Kapsoid oder eine polymere Nano- oder Mikrokapsel kann die Aufnahme der dsRNA in Zellen erleichtern. Das Medikament kann eine Zubereitung aufweisen, 20 die zur Inhalation, oralen Aufnahme oder Injektion, insbesondere zur intravenösen oder intraperitonealen Injektion oder zur Injektion direkt in ein befallenes Knochenmark, geeignet ist. Eine zur Inhalation oder Injektion geeignete Zubereitung kann im einfachsten Fall aus einer physiologisch verträglichen Lösung, insbesondere einem physiologisch verträglichen Puffer, vorzugsweise einer phosphatgepufferten Salzlösung, und der dsRNA bestehen. Es hat sich nämlich überraschenderweise herausgestellt, dass eine lediglich in einer solchen Lösung oder einem solchen Puffer gelöste dsRNA von den Zellen 25 aufgenommen wird und die Expression des Zielgens hemmt, ohne 30

dass die dsRNA dazu in ein besonderes Vehikel verpackt werden muss.

Ferner betrifft die Erfindung eine doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA) zur Hemmung der Expression eines durch eine Chromosomen-Aberration entstandenen aus mindestens zwei Genen an einer Fusionsstelle fusionierten Zielgens, wobei das Zielgen einen die Fusionsstelle enthaltenden Abschnitt A aufweist und ein Strang S1 der dsRNA einen zu dem Abschnitt A

zumindest abschnittsweise komplementären Bereich aufweist.

Der Abschnitt A weist dabei zumindest zwei Nukleotide auf jeder Seite der Fusionsstelle und der komplementäre Bereich des Strangs S1 der dsRNA 19 bis 24 Nukleotide auf. Vorteilhafte Ausgestaltungen der dsRNA können den Ansprüchen 36 bis 49 sowie der vorstehenden Beschreibung entnommen werden. Weiterhin betrifft die Erfindung eine Verwendung einer erfindungsgemäßen doppelsträngigen Ribonukleinsäure (dsRNA) zur Hemmung der Expression eines durch eine Chromosomen-Aberration entstandenen aus mindestens zwei Genen fusionierten Zielgens.

20

Nachfolgend werden anhand der Figuren Ausführungsbeispiele der Erfindung erläutert. Es zeigen:

Fig. 1 ein Autoradiogramm einer RNase-Protektion und

25

Fig. 2 eine graphische Darstellung des jeweiligen Verhältnisses der Intensität einer Bande AML-1/MTG8-spezifischer Fragmente zur Intensität einer Bande AML-1-spezifischer Fragmente auf jeweils einer Spur des in Fig. 1 gezeigten Autoradiogramms.

30

Die für Transfektionen eingesetzten doppelsträngigen Oligoribonukleotide weisen die folgenden, im Sequenzprotokoll mit SEQ ID NO:1 bis SEQ ID NO:6 bezeichneten, Sequenzen auf:

5 AGF2: dsRNA, deren einer Strang S1 zu einer ersten Sequenz aus einem aus den Genen für AML-1 und MTG8 fusionierten Gen (AML-1/MTG8-Gen) komplementär ist:

S2: 5' -CCUCGAAUCGUACUGAGAAG-3' (SEQ ID NO: 2)

10 S1: 3' -UUGGAGCUUUAGCAUGACUCUUC-5' (SEQ ID NO: 1)

AGF3L: dsRNA mit derselben Sequenz wie AGF2 und einer Verknüpfung zwischen dem 5'-Ende des Strangs S1 und dem 3'-Ende des Strangs S2 durch einen Hexaethylenglykol-Linker:

15

S2: 5' -CCUCGAAUCGUACUGAGAAG (SEQ ID NO: 2)

Linker

S1: 3' -UUGGAGCUUUAGCAUGACUCUUC (SEQ ID NO: 1)

20 Die bei den Darstellungen von AGF2 und AGF3L unterstrichenen Sequenzen entsprechen dem zum MTG8-Gen komplementären und die nicht unterstrichenen Sequenzen dem zum AML-1-Gen komplementären Bereich der jeweiligen dsRNA.

25 K3: Kontroll-dsRNA, deren einer Strang S1 zu einer Sequenz aus dem 5'-untranslatierten Bereich eines Neomycin-Resistenz-Gens komplementär ist:

S2: 5' -GAUGAGGAUCGUUUCGCAUGA-3' (SEQ ID NO: 4)

30 S1: 3' -UCCUACUCCUAGCAAAGCGUACU-5' (SEQ ID NO: 3)

35 HCV10L: Kontroll-dsRNA, deren einer Strang S1 zu einer Sequenz aus dem HCV-Gen komplementär ist und eine Verknüpfung zwischen dem 5'-Ende des Strangs S1 und dem 3'-Ende des Strangs S2 durch einen Hexaethylenglykol-Linker aufweist:

S2 5'-ACGGCUAGCUGUGAAAGGUCC (SEQ ID NO: 6)

Linker

S1 3'-AGUGCCGAUCGACACUUUCCAGG (SEQ ID NO: 5)

5

Die RNA-Einzelstränge wurden mit einem RNA-Synthesizer (Typ Expedite 8909, Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) und herkömmlichen chemischen Verfahren synthetisiert. Anschließend erfolgte die Reinigung der rohen Syntheseprodukte mit Hilfe der HPLC. Als Säulen wurden NucleoPac PA-100, 9x250 mm der Fa. Dionex, verwendet. Als Niedersalz-Puffer diente 20 mM Tris, 10 mM NaClO<sub>4</sub>, pH 6,8, 10% Acetonitril und als Hochsalz-Puffer 20 mM Tris, 400 mM NaClO<sub>4</sub>, pH 6,8, 10% Acetonitril. Der Fluß betrug 3 ml/Minute. Die Hybridisierung der Einzelstränge (je 10 µM) zum Doppelstrang erfolgte durch Erhitzen des stöchiometrischen Gemisches der Einzelstränge auf 95°C für 5 Minuten in 25 mM Tris-HCl pH 7,5 und 100 mM NaCl und anschließendes Abkühlen über 30 Minuten auf 37°C.

20 Für die Transfektionsexperimente wurde die Zelllinie Kasumi-1 (Asou, H. et al. (1991) Blood 77, 2031-2036), welche die Translokation t(8;21) aufweist, verwendet. Pro Transfektionsansatz wurden 10<sup>6</sup> Zellen in 100 µl RPMI1640 mit 10% FCS in eine 0,4 cm breite Elektroporationsküvette pipettiert. Nach 25 Zugabe von dsRNAs bis zu einer Endkonzentration von 200 nM wurden die Zellen bei 300 V für 10 ms mittels eines Fischer-Elektroporators (Fischer, Heidelberg) elektroporiert. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Zellsuspension in 2 ml RPMI1640 mit 10% fötalem Kälberserum überführt und bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit für 20 Stunden inkubiert.

Die cytoplasmatische RNA wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (QIAGEN GmbH, Max-Volmer-Straße 4, 40724 Hilden, Deutschland)

aufgereinigt. Diese RNA wurde einer RNase-Protektion-Untersuchung unterzogen, wie sie in Ausubel, F. M. et. al., Current Protocols in Molecular Biology (1993), Greene and Wiley, New York, NY, USA beschrieben ist. Das beschriebene Verfahren  
5 wurde dazu wie folgt modifiziert: Das Hybridisierungsvolumen wurde auf 15  $\mu$ l reduziert, die Hybridisierungstemperatur betrug 60°C und der RNase-Verdau wurde in einem Gesamtvolumen von 175  $\mu$ l durchgeführt. Die Denaturierungstemperatur betrug 95°C. Die Verdauung der Hybride erfolgte mit RNaseT1. Die  
10 RNA-Sonde, welche einen zur AML-1/MTG8-mRNA komplementären der Fusionsstelle entsprechenden Bereich enthält, weist die folgende 315 Nukleotide lange Sequenz (SEQ ID NO: 7 im Sequenzprotokoll) auf:

15 5'-GGCGAAUUG GAGCUCCACC GCGGUGGCGG CCGCUCUAGA ACUAGUGGAU  
CCCCAACGU UGUCGGUGUA AAUGAACUGG UUCUUGGAGC UCCUUGAGUA  
GUUGGGGGAG GUGGCAUUGU UGGAGGAGUC AGCCUAGAUU GCGUCUUCAC  
AUCCACAGGU GAGUCUGGCA UUGUGGAGUG CUUCUCAGUA CGAUUUCGAG  
GUUCUCGGGG CCCAUCCACU **GUGAUUUUGA** **UGGCUCUGUG** **GUAGGUGGCG**  
20 **ACUUGC GGUG GUUUGUGAA** **GACAGUGAUG** **GUCAGAGUGA** **AGCUUAUCGA**  
UACCGUCGAC CUCGA-3'

In der Darstellung dieser Sequenz ist die durch AML1/MTG8-mRNA geschützte Sequenz unterstrichen und die durch die AML1-mRNA geschützte Sequenz fett gedruckt.  
25

Die RNA wurde nach der RNase-Behandlung in einem denaturierenden 6%igen Polyacrylamidgel separiert und mittels Phosphoimaging quantifiziert. Die Autoradiographie des Polyacrylamidgels ist in Fig. 1 dargestellt. Die durch die Elektroporation in die Zellen eingeführten dsRNAs sind jeweils oberhalb der Spuren 2 bis 5 angegeben. Die in Spur 1 aufgetragene RNA-Sonde ist mit cytoplasmatischer RNA aus Zellen inkubiert  
30

worden, welche in Abwesenheit von dsRNA elektroporiert worden sind. Die in Spur 6 aufgetragene RNA-Sonde ist zur Kontrolle anstatt mit der aus Zellen isolierten cytoplasmatischen RNA mit tRNA inkubiert worden. Ansonsten erfolgte die RNase-  
5 Behandlung der in den Spuren 1 und 6 aufgetragenen RNA-Sonden unter identischen Bedingungen, wie bei den in den Spuren 2 bis 5 aufgetragenen RNA-Sonden. Spur 7 zeigt die unverdaute RNA-Sonde.

10 In allen Ansätzen sind sowohl AML-1/MTG8-spezifische Fragmente mit einer Länge von 240 Nukleotiden als auch AML-1-spezifische Fragmente mit einer Länge von 100 Nukleotiden zu sehen, auf die in Fig. 1 durch Pfeile hingewiesen wird. Die durch AML-1-mRNA geschützten Fragmente weisen die Sequenz ge-  
15 mäß SEQ ID NO: 8 und die durch AML-1/MTG8-mRNA geschützten Fragmente die Sequenz gemäß SEQ ID NO: 9 im Sequenzprotokoll auf. Die den 100 Nukleotide langen Fragmenten entsprechenden Banden zeigen die Expression des nicht translozierten Wildtyps parallel an. Weder Kontroll- noch AML-1/MTG8-spezifische  
20 dsRNAs reduzieren das AML-1-Signal für die nicht-fusionierte mRNA (Fig. 1, vergleiche Spur 1 mit Spuren 3 und 5). Im Gegensatz zu den Kontroll-dsRNAs (K3 und HCV10L, Fig. 1, Spuren 3 und 5) reduzieren jedoch sowohl die aus zwei Ribooligonukleotiden hybridisierte dsRNA AGF2 (spezifisch für die AML-  
25 1/MTG8 Fusions-mRNA, Fig. 1, Spur 2) als auch die durch intramolekulare Hybridisierung entstandene monomolekulare dsRNA AGF3L, bei der beide Stränge durch den Hexaethylenglykol-Linker verknüpft sind (Fig. 1, Spur 4), das AML-1/MTG8-Signal.

30

In Fig. 2 ist jeweils als Säule das Verhältniss der Intensität der Bande der AML-1/MTG8-spezifischen Fragmente zur Intensität der Bande der AML-1-spezifischen Fragmente auf je-

weils einer Spur des in Fig. 1 gezeigten Autoradiogramms dargestellt. Die Intensitäten sind mittels Phosphoimaging bestimmt worden. Die durch die Elektroporation in die Zellen eingeführten dsRNAs sind jeweils unterhalb der entsprechenden 5 Säule angegeben. Während sowohl bei Zellen, die in Abwesenheit von dsRNA elektroporiert wurden, als auch bei mit Kontroll-dsRNA transfizierten Zellen das Verhältnis der Intensitäten zwischen 1,1 und 1,4 schwankt, führt die Elektroporation in Gegenwart von AML-1/MTG8-spezifischen dsRNAs zu einer 10 Reduktion des Verhältnisses auf 0,4 bis 0,6. Damit ist gezeigt, dass sowohl bimolekulare dsRNA als auch ein monomolekulares, mit einem Hexaethylenglykol-Linker versehenes dsRNA-Molekül die Expression des leukämischen Fusionsgens AML-1/MTG8 auf 46% reduziert. Diese Inhibition ist spezifisch. 15 Die Expression des nichttranslozierten Allels wird durch die hier verwendeten dsRNA-Moleküle nicht beeinflusst. Berücksichtigt man eine abgeschätzte Porationseffizienz von 50 %, so wird deutlich, dass in allen elektroporierten Zellen, und damit in allen Zellen, in die eine dsRNA eingefügt wird ist, 20 die Fusions-mRNA vollständig einem intrazellulären Abbau zugeführt wird.

Zum weiteren Beleg der Ausführbarkeit der Erfindung wird der Offenbarungsgehalt des nachveröffentlichten Dokuments Scherr, 25 M. et al., "Specific inhibition of bcr-abl gene expression by small interfering RNA", Blood 2002, Online veröffentlicht am 26 September 2002, DOI 10.1182/blood-2002-06-1685, vollinhaltlich in die vorliegenden Ausführungsbeispiele einbezogen. Das Dokument offenbart die spezifische Inhibition der Expression 30 des Fusionsgens bcr-abl mittels eines erfindungsgemäßen Verfahrens. Die zellulären Gene c-abl und c-bcr bleiben dabei in ihrer Expression unbeeinflusst.

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Hemmung der Expression eines durch eine Chromosomen-Aberration entstandenen aus mindestens zwei Genen an einer Fusionsstelle fusionierten Zielgens in einer Zelle, wobei das Zielgen einen die Fusionsstelle enthaltenden Abschnitt A aufweist und mindestens eine doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA) in die Zelle eingebracht wird, deren erster Strang S1 einen zu dem Abschnitt A zumindest abschnittsweise komplementären Bereich aufweist, wobei der Abschnitt A zumindest zwei Nukleotide auf jeder Seite der Fusionsstelle und der komplementäre Bereich des Strangs S1 der dsRNA 19 bis 24 Nukleotide aufweist.  
10
- 15 2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der Abschnitt A zumindest drei Nukleotide auf jeder Seite der Fusionsstelle aufweist.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei zumindest ein Ende der dsRNA einen aus 1 bis 4, insbesondere 1 oder 2, Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist.  
20
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei sich der einzelsträngige Überhang am 3'-Ende des Strangs S1 befindet.
- 25 5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA nur an einem, insbesondere dem am 3'-Ende des Strangs S1 gelegenen, Ende einen einzelsträngigen Überhang aufweist.

6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der komplementäre Bereich des Strangs S1 der dsRNA 20 bis 23, insbesondere 22, Nukleotide aufweist.
7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei 5 der Strang S1 weniger als 30, vorzugsweise weniger als 25, besonders vorzugsweise 21 bis 24, Nukleotide aufweist.
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei 10 mindestens ein Ende der dsRNA modifiziert wird, um einem Abbau in der Zelle oder einer Dissoziation in die Einzelstränge entgegenzuwirken.
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei 15 der durch komplementäre Nukleotidpaare bewirkte Zusammenhalt der dsRNA durch mindestens eine, vorzugsweise zwei, weitere chemische Verknüpfung/en erhöht wird.
10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei die Verknüpfung an einem Ende der dsRNA, insbesondere durch Verbindung mittels eines Hexaethylenglykol-Linkers, gebildet wird.
11. Verfahren nach Anspruch 9 oder 10, wobei die Verknüpfung 20 zwischen dem 5'-Ende des Strangs S1 und dem 3'-Ende eines zweiten Strangs S2 der dsRNA gebildet wird.
12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Zielgen ein aus den Genen für AML-1 und für MTG8 fusioniertes Gen ist.
- 25 13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA aus dem Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 und dem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 gemäß dem anliegenden Sequenzprotokoll besteht.

14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Zelle ein Leukozyt, insbesondere eine myeloische Zelle, ist.
15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA mittels einer die dsRNA umschließenden micellaren Struktur, vorzugsweise einem Liposom, oder polymeren Nano- oder Mikrokapsel oder eines die dsRNA umschließenden Kapsids oder Kapsoids oder an einer polymeren Nano- oder Mikrokapsel gebunden in die Zelle eingebracht wird.
16. Medikament zur Therapie einer durch eine Chromosomen-Aberration verursachten Erkrankung enthaltend mindestens eine doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA) zur Hemmung der Expression eines durch die Chromosomen-Aberration entstandenen aus mindestens zwei Genen an einer Fusionsstelle fusionierten Zielgens, wobei das Zielgen einen die Fusionsstelle enthaltenden Abschnitt A aufweist und ein Strang S1 der dsRNA einen zu dem Abschnitt A zumindest abschnittsweise komplementären Bereich aufweist, wobei der Abschnitt A zumindest zwei Nukleotide auf jeder Seite der Fusionsstelle und der komplementäre Bereich des Strangs S1 der dsRNA 19 bis 24 Nukleotide aufweist.
17. Medikament nach Anspruch 16, wobei der Abschnitt A zumindest drei Nukleotide auf jeder Seite der Fusionsstelle aufweist.
18. Medikament nach Anspruch 16 oder 17, wobei zumindest ein Ende der dsRNA einen aus 1 bis 4, insbesondere 1 oder 2, Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist.

19. Medikament nach einem der Ansprüche 16 bis 18, wobei sich der einzelsträngige Überhang am 3'-Ende des Strangs S1 befindet.

20. Medikament nach einem der Ansprüche 16 bis 19, wobei die  
5 dsRNA nur an einem, insbesondere dem am 3'-Ende des Strangs S1 gelegenen, Ende einen einzelsträngigen Überhang aufweist.

21. Medikament nach einem der Ansprüche 16 bis 20, wobei der komplementäre Bereich des Strangs S1 der dsRNA 20 bis 23,  
10 insbesondere 22, Nukleotide aufweist.

22. Medikament nach einem der Ansprüche 16 bis 21, wobei der Strang S1 weniger als 30, vorzugsweise weniger als 25, besonders vorzugsweise 21 bis 24, Nukleotide aufweist.

23. Medikament nach einem der Ansprüche 16 bis 22, wobei mindestens ein Ende der dsRNA modifiziert ist, um einem Abbau in den Zellen oder einer Dissoziation in die Einzelstränge entgegenzuwirken.  
15

24. Medikament nach einem der Ansprüche 16 bis 23, wobei der durch komplementäre Nukleotidpaare bewirkte Zusammenhalt  
20 der dsRNA durch mindestens eine, vorzugsweise zwei, weitere chemische Verknüpfung/en erhöht ist.

25. Medikament nach einem der Ansprüche 16 bis 24, wobei die Verknüpfung an einem Ende der dsRNA, insbesondere durch Verbindung mittels eines Hexaethylenglykol-Linkers, gebildet ist.  
25

26. Medikament nach einem der Ansprüche 16 bis 25, wobei die Verknüpfung zwischen dem 5'-Ende des Strangs S1 und dem 3'-Ende eines zweiten Strangs S2 der dsRNA gebildet ist.

27. Medikament nach einem der Ansprüche 16 bis 26, wobei das Zielgen ein aus den Genen für AML-1 und für MTG8 fusioniertes Gen ist.
28. Medikament nach einem der Ansprüche 16 bis 27, wobei die 5 dsRNA aus dem Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 und dem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 gemäß dem anliegenden Sequenzprotokoll besteht.
29. Medikament nach einem der Ansprüche 16 bis 28, wobei die 10 Erkrankung eine akute myeloische Leukämie oder eine chronisch myeloische Leukämie ist.
30. Medikament nach einem der Ansprüche 16 bis 29, wobei die 15 dsRNA in dem Medikament in einer Lösung oder von einer micellaren Struktur, vorzugsweise einem Liposom, einem Kapsid, einem Kapsoid oder einer polymeren Nano- oder Mikrokapsel umschlossen oder an einer polymeren Nano- oder Mikrokapsel gebunden vorliegt.
31. Medikament nach einem der Ansprüche 16 bis 30, wobei das 20 Medikament eine Zubereitung aufweist, die zur Inhalation, oralen Aufnahme oder Injektion, insbesondere zur intravenösen oder intraperitonealen Injektion oder zur Injektion direkt in ein befallenes Knochenmark, geeignet ist.
32. Medikament nach Anspruch 31, wobei die Zubereitung aus 25 einer physiologisch verträglichen Lösung, insbesondere einem physiologisch verträglichen Puffer, vorzugsweise einer phosphatgepufferten Salzlösung, und der dsRNA besteht.
33. Doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA) zur Hemmung der 30 Expression eines durch eine Chromosomen-Aberration entstandenen aus mindestens zwei Genen an einer Fusionsstelle fusionierten Zielgens, wobei das Zielgen einen die Fu-

sionsstelle enthaltenden Abschnitt A aufweist und ein Strang S1 der dsRNA einen zu dem Abschnitt A zumindest abschnittsweise komplementären Bereich aufweist, wobei der Abschnitt A zumindest zwei Nukleotide auf jeder Seite der Fusionsstelle und der komplementäre Bereich des Strangs S1 der dsRNA 19 bis 24 Nukleotide aufweist.

- 5 34. dsRNA nach Anspruch 33, wobei der Abschnitt A zumindest drei Nukleotide auf jeder Seite der Fusionsstelle aufweist.
- 10 35. dsRNA nach Anspruch 33 oder 34, wobei zumindest ein Ende der dsRNA einen aus 1 bis 4, insbesondere 1 oder 2, Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist.
- 15 36. dsRNA nach einem der Ansprüche 33 bis 35, wobei sich der einzelsträngige Überhang am 3'-Ende des Strangs S1 befindet.
37. dsRNA nach einem der Ansprüche 33 bis 36, wobei die dsRNA nur an einem, insbesondere dem am 3'-Ende des Strangs S1 gelegenen, Ende einen einzelsträngigen Überhang aufweist.
- 20 38. dsRNA nach einem der Ansprüche 33 bis 37, wobei der komplementäre Bereich des Strangs S1 der dsRNA 20 bis 23, insbesondere 22, Nukleotide aufweist.
- 25 39. dsRNA nach einem der Ansprüche 33 bis 38, wobei der Strang S1 weniger als 30, vorzugsweise weniger als 25, besonders vorzugsweise 21 bis 24, Nukleotide aufweist.
40. dsRNA nach einem der Ansprüche 33 bis 39, wobei mindestens ein Ende der dsRNA modifiziert ist, um einem Abbau in der Zelle oder einer Dissoziation in die Einzelstränge entgegenzuwirken.

41. dsRNA nach einem der Ansprüche 33 bis 40, wobei der durch komplementäre Nukleotidpaare bewirkte Zusammenhalt der dsRNA durch mindestens eine, vorzugsweise zwei, weitere chemische Verknüpfung/en erhöht ist.

5 42. dsRNA nach einem der Ansprüche 33 bis 41, wobei die Verknüpfung an einem Ende der dsRNA, insbesondere durch Verbindung mittels eines Hexaethylenglykol-Linkers, gebildet ist.

10 43. dsRNA nach einem der Ansprüche 33 bis 42, wobei die Verknüpfung zwischen dem 5'-Ende des Strangs S1 und dem 3'-Ende eines zweiten Strangs S2 der dsRNA gebildet ist.

44. dsRNA nach einem der Ansprüche 33 bis 43, wobei das Zielgen ein aus den Genen für AML-1 und für MTG8 fusioniertes Gen ist.

15 45. dsRNA nach einem der Ansprüche 33 bis 44, wobei die dsRNA aus dem Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 und dem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 gemäß dem anliegenden Sequenzprotokoll besteht.

20 46. dsRNA nach einem der Ansprüche 33 bis 45, wobei die dsRNA von einer micellaren Struktur, vorzugsweise einem Liposom, einem Kapsid, einem Kapsoid oder einer polymeren Nano- oder Mikrokapsel umschlossen oder an einer polymeren Nano- oder Mikrokapsel gebunden ist.

25 47. Verwendung einer doppelsträngigen Ribonukleinsäure (dsRNA) gemäß einem der Ansprüche 33 bis 46 zur Hemmung der Expression eines durch eine Chromosomen-Aberration entstandenen aus mindestens zwei Genen fusionierten Zielgens.

1/2

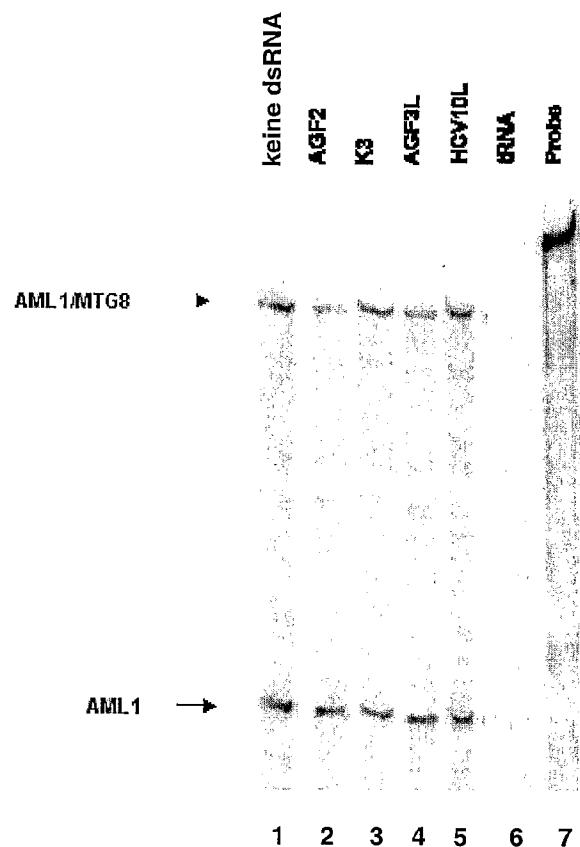


Fig. 1

2/2

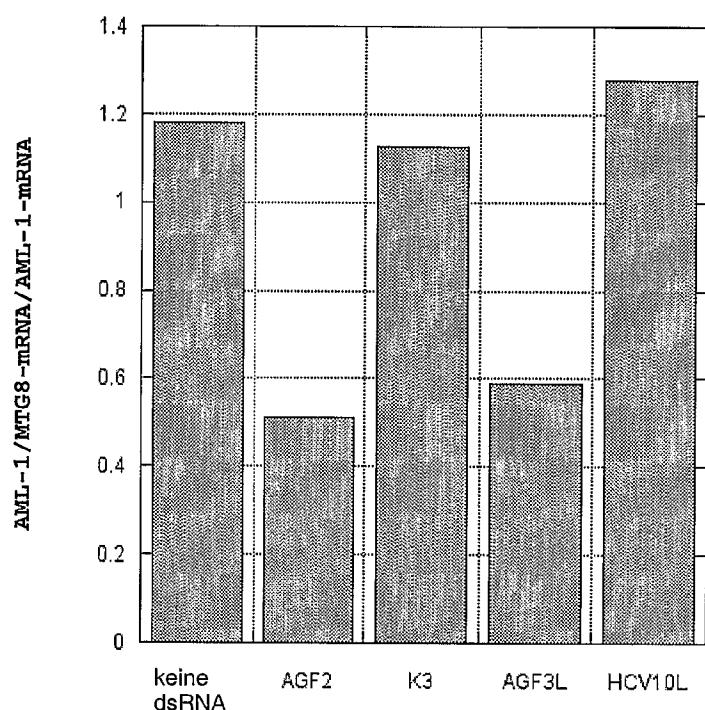


Fig. 2

## SEQUENZPROTOKOLL

5 <110> Ribopharma AG

10 <120> Verfahren zur Hemmung der Expression eines durch eine Chromosomen-  
Aberration entstandenen Zielgens

15 <130> 422518EH

20 <160> 9

25 <170> PatentIn version 3.1

30 <210> 1

<211> 23

35 <212> RNA

<213> Homo sapiens

40 <400> 1

cuucucagua cgauuucgag guu

23

45 <210> 2

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

50 <400> 2

ccucgaaauc guacugagaa g

21

55 <210> 3

<211> 23

<212> RNA

60 <213> Künstliche Sequenz

5                   <400> 3  
5                   ucaugcgaaa cgauccuau ccu                   23

10                  <210> 4  
10                  <211> 21  
10                  <212> RNA  
10                  <213> Künstliche Sequenz

15                  <400> 4  
15                  gaugagggau c guuucgcaug a                   21

20                  <210> 5  
20                  <211> 23  
20                  <212> RNA

25                  <213> Hepatitis C virus

30                  <400> 5  
30                  ggaccuuuca c agcuagccg uga                   23

35                  <210> 6  
35                  <211> 21  
35                  <212> RNA

40                  <213> Hepatitis C virus

45                  <400> 6  
45                  acggcuagcu gugaaagguc c                   21

50                  <210> 7  
50                  <211> 315  
50                  <212> RNA

55                  <213> Homo sapiens

60                  <400> 7  
60                  gggcgaaauug gagcuccacc gcgguggcgg ccgcucuaga acuaguggau cccccaacgu                   60

ugucggugua aaugaacugg uucuuggagc uccuugagua guugggggag guggcauugu 120  
uggaggaguc agccuagauu gcgucuucac auccacaggu gagucuggca uuguggagug 180  
5 cuucucagua cgauuucgag guucucgggg cccauccacu gugauuuuga uggcucugug 240  
guagguggcg acuuugcgug gguuugugaa gacagugaug gucagaguga agcuaucga 300  
uaccgucgac cucga 315  
10  
<210> 8  
<211> 100  
15 <212> RNA  
<213> Homo sapiens  
20  
<400> 8  
ucgagguucu cggggcccau ccacugugau uuugauggcu cugugguagg uggcgacuug 60  
25 cgguggguuu gugaagacag ugauggucag agugaagcuu 100  
  
<210> 9  
30 <211> 240  
<212> RNA  
<213> Homo sapiens  
35  
<400> 9  
40 aacguugucg guguaaauga acugguucuu ggagcuccuu gaguaguugg gggagguggc 60  
auuguuggag gagucagccu agauugcguc uucacaucca caggugaguc ugcauugug 120  
gagugcuccu caguacgauu ucgagguucu cggggcccau ccacugugau uuugauggcu 180  
45 cugugguagg uggcgacuug cgguggguuu gugaagacag ugauggucag agugaagcuu 240